PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :
C07K 7/00

A2

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/46632

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Oktober 1998 (22.10.98)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/02179

(22) Internationales Anmeldedatum: 14. April 1998 (14.04.98)

(30) Prioritätsdaten:
97 106 024.9 11. April 1997 (11.04.97) EP
(34) Länder für die die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist: DE usw.

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: WILEX BIOTECHNOLOGY GMBH [DE/DE]; Grillparzer Strasse 10 B, D–81675 München (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: KESSLER, Horst [DE/DE]; Friedrich–Stolze–Strasse 53, D–65824 Schwalbach–Limes (DE). GRAEFF, Heinrich [DE/DE]; Josef–Schwarz–Weg 11, D–81479 München (DE). SCHMITT, Manfred [DE/DE]; Hohenaschauer Strasse 10, D–81669 München (DE). MAGDOLEN, Viktor [US/DE]; Moosachweg 3, D–85551 Kirchheim (DE). WILHELM, Olaf, G. [DE/DE]; Säbener Strasse 188, D–81545 München (DE). RIEMER, Christoph [DE/DE]; Prinzregentenstrasse 139, D–81677 München (DE). BÜRGLE, Markus [DE/DE]; Ötschmannweg 10, D–81369 München (DE).

(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D–81679 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht
Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: INHIBITORS FOR UROKINASE RECEPTOR

(54) Bezeichnung: INHIBITOREN FÜR DEN UROKINASEREZEPTOR

(57) Abstract

Disclosed are peptides as agents for inhibiting urokinase adhesion to its receptor. Said peptides, preferably cyclical, are suitable as active agents for treating diseases transmitted by the urokinase or the receptor thereof.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Peptide als Inhibitoren für die Bindung von Urokinase an den Urokinaserezeptor. Diese vorzugsweise zyklischen Peptide sind als pharmazeutische Wirkstoffe für Krankheiten geeignet, die durch Urokinase und ihren Rezeptor vermittelt werden.

BNSDOCID: <WO___9846632A2_I_>

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	**ES**	Spanien	**LS**	Lesotho	**SI**	Slowenien
AM	Armenien	**FI**	Finnland	**LT**	Litauen	**SK**	Slowakei
AT	Österreich	**FR**	Frankreich	**LU**	Luxemburg	**SN**	Senegal
AU	Australien	**GA**	Gabun	**LV**	Lettland	**SZ**	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MC**	Monaco	**TD**	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	**GE**	Georgien	**MD**	Republik Moldau	**TG**	Togo
BB	Barbados	**GH**	Ghana	**MG**	Madagaskar	**TJ**	Tadschikistan
BE	Belgien	**GN**	Guinea	**MK**	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	**TM**	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	**GR**	Griechenland			**TR**	Türkei
BG	Bulgarien	**HU**	Ungarn	**ML**	Mali	**TT**	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	**IE**	Irland	**MN**	Mongolei	**UA**	Ukraine
BR	Brasilien	**IL**	Israel	**MR**	Mauretanien	**UG**	Uganda
BY	Belarus	**IS**	Island	**MW**	Malawi	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	**IT**	Italien	**MX**	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	**JP**	Japan	**NE**	Niger	**UZ**	Usbekistan
CG	Kongo	**KE**	Kenia	**NL**	Niederlande	**VN**	Vietnam
CH	Schweiz	**KG**	Kirgisistan	**NO**	Norwegen	**YU**	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**NZ**	Neuseeland	**ZW**	Zimbabwe
CM	Kamerun			**PL**	Polen		
CN	China	**KR**	Republik Korea	**PT**	Portugal		
CU	Kuba	**KZ**	Kasachstan	**RO**	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	**LC**	St. Lucia	**RU**	Russische Föderation		
DE	Deutschland	**LI**	Liechtenstein	**SD**	Sudan		
DK	Dänemark	**LK**	Sri Lanka	**SE**	Schweden		
EE	Estland	**LR**	Liberia	**SG**	Singapur		

BNSDOCID: <WO___9846632A2_I_>

Inhibitoren für den Urokinaserezeptor

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Peptide als Inhibitoren der Bindung von Urokinase an den Urokinaserezeptor. Diese vorzugsweise zyklischen Peptide sind als pharmazeutische Wirkstoffe für Krankheiten geeignet, die durch Urokinase und ihren Rezeptor vermittelt werden.

Die Serinprotease uPA (Urokinase-Typ-Plasminogenaktivator) ist für verschiedene physiologische und pathologische Prozesse verantwortlich, wie etwa den proteolytischen Abbau von extrazellulärem Matrixmaterial, das für die Invasibilität und Wanderung von Zellen sowie für die Geweberemodellierung notwendig ist. uPA bindet mit hoher Affinität ($K_D=10^{-10}$-10^{-9}M) an den membranständigen uPA Rezeptor (uPAR) auf der Zelloberfläche.

Die Bindung von uPA an seinen Rezeptor ist an vielen invasiven biologischen Prozessen wie etwa der Metastasierung bösartiger Tumoren, der Trophoplastenimplantation, Entzündungen und Angiogenese beteiligt. Daher sind Antagonisten von uPA in der Lage, die Invasivität, Metastasierung und Angiogenese von Tumoren zu hemmen. uPA-Antagonisten können als Mittel zur Therapie invasiver und metastasierender Krebserkrankungen eingesetzt werden, bei denen uPA und uPAR an den invasiven Foci von Tumoren auftreten (Dano et al.: The receptor for urokinase plasminogen activator: Stromal cell involvement in extracellular proteolysis during cancer invasion, in: Proteolysis and Protein Turnover, Barrett, A. J. und Bond, J., HRSG, Portland Press, London, 1994, 239), z. B. bei Krebserkrankungen von Brust, Lunge, Darm und Ovarien. Darüber hinaus können uPA-Antagonisten auch für andere Zwecke eingesetzt werden, bei denen eine Hemmung der proteolytischen Aktivierung von Plasminogen erforderlich ist, beispielsweise zur Bekämpfung von Krankheiten wie Arthritis, Entzündungen, Osteoporose, Retinopathien und zur Kontrazeption.

BNSDOCID: <WO__9846632A2_I_>

Der uPA Rezeptor ist in WO 90/ 12091 sowie in den Veröffentlichungen Ploug et al., J. Biol. Chem. 268 (1993), 17539 und Ronne et al., J. Immunol. Methods 167 (1994), 91 beschrieben.

uPA wird als einzelkettiges Molekül (pro-uPA) synthetisiert und enzymatisch in einen aktiven zweikettigen uPA überführt. Das uPA Molekül besteht aus drei strukturell unabhängigen Domänen, der N-terminal lokalisierten wachstumsfaktorartigen Domäne (GFD, uPA 1 - 46), einer Kringelstrukturdomäne (uPA 45 - 135) und der Serinproteasedomäne (uPA 159 - 411). GFD und die Kringeldomäne bilden zusammen das sogenannte aminoterminale Fragment von uPA (ATF, uPA 1 - 135), das durch weitere proteolytische Spaltung von zweikettigem uPA erzeugt wird. ATF bindet an den uPA Rezeptor mit einer ähnlichen Affinität wie uPA.

Die rezeptorbindende Region von uPA erstreckt sich über den Bereich der Aminosäuren 12 bis 32, da ein Peptid, welches die Aminosäurereste 12 bis 32 von uPA enthält (wobei Cystein an Position 19 durch Alanin ersetzt ist) mit ATF um die Bindung an den uPA Rezeptor kompetiert (Appella et al., J. Biol. Chem. 262 (1987), 4437-4440). Weiterhin wurde dort gezeigt, daß dieses Peptid auch nach Zyklisierung durch Verbrückung der beiden Cysteinreste an den Positionen 12 und 32 eine Affinität für den uPA Rezeptor zeigt. In einem alternativen Ansatz wurden von Goodson et al., (Proc. Natl. Acad. USA 91 (1994), 7129-7133) antagonistische uPA-Peptide für den uPAR mittels Musterung einer Bakteriophagen-Peptidbibliothek identifiziert. Diese Peptide zeigten keine ersichtliche Sequenzhomologie zu der natürlichen uPAR-bindenden Sequenz von uPA.

In neueren Veröffentlichungen (Rettenberger et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler 376 (1995), 587-594); Magdolen et al., Eur. J. Biochem. 237 (1996), 743-751; Goretzki et al., Fibrinolysis and Proteolysis 11 (1997), 11-19) sind weitere Untersuchungen an der uPAR-Bindungsregion des uPA beschrieben. Dabei wurden die Reste Cys19, Lys23, Thyr24, Phe25, Ile28, Trp30 und Cys31

BNSDOCID: <WO___9846632A2_I_>

als wichtige Determinanten für eine uPA/uPAR-Wechselwirkung identifiziert. Als wirksamster Inhibitor wurde in diesen Untersuchungen ein uPA-Peptid mit den Aminosäuren 16 bis 32 von uPA identifiziert.

Magdolen et al. (1996) supra, analysieren die uPAR-Bindungsregion des uPA-Moleküls unter der Verwendung eines Peptids mit den Aminosäuren 14 bis 32 von uPA und davon abgeleiteten Peptiden. Diese sowie auch die von anderen Arbeitsgruppen verwendeten Peptide (vgl. z.B. Appella et al. (1987) supra) weisen jedoch eine relativ geringe Affinität zum uPAR auf.

WO-A-94/22646 offenbart lineare Peptide mit einer Länge von 6 bis 18 Aminosäuren, die aus dem Bereich der Aminosäuren 14 bis 33 von uPA stammen. Es wird beschrieben, daß kurze von uPA abgeleitete Peptide (uPA 21-29 und uPA 21-26) in der Lage sind, das Wachstum von Keratinozyten zu beeinflussen. Zwar wird in WO-A-94/22646 auf einen möglichen Einsatz der beanspruchten Peptide für die Blockierung der uPA/uPAR-Wechselwirkung hingewiesen, es werden jedoch keinerlei Daten oder Hinweise auf derartige Bindungsstudien gezeigt. Darüber hinaus enthalten die als bevorzugt genannten linearen Peptide uPA 21-29 und uPA 21-26 nicht die minimale uPAR-Bindungsregion von linearen uPA-Peptiden, welche den Sequenzbereich der Aminosäuren 19 bis 31 umfaßt. Die Beeinflussung des Wachstums von Keratinozyten durch diese kurzen Peptide beruht somit sehr wahrscheinlich nicht auf einer uPA/uPAR-Wechselwirkung.

Ein Nachteil der bisher bekannten uPA-Peptidinhibitoren besteht jedoch darin, daß sie eine relativ geringe Affinität der Bindung an den uPA Rezeptor zeigen, die für eine therapeutische Anwendung nicht ausreichend ist. Aufgrund dessen besteht ein großes Bedürfnis nach neuen uPA-Peptidantagonisten, die eine höhere Affinität für den Rezeptor aufweisen.

Überraschenderweise wurde in quantitativen Untersuchungen festgestellt, daß das lineare Peptid uPA (19-31), zyklische Derivate dieses Peptids und sequenzmodifizierte Peptide aus

BNSDOCID: <WO__9846632A2_I_>

diesem uPA-Bereich eine deutlich verbesserte Affinität der Bindung an den uPA-Rezeptor zeigen.

Die Verwendbarkeit der erfindungsgemäßen Peptide als uPA-Antagonisten, die mit hoher Affinität an uPAR binden, wird durch experimentelle Daten belegt. Besonders bevorzugt sind dabei zyklische Peptide, die sich durch nicht im nativen uPA-Molekül vorkommende Verbrückungen, insbesondere Disulfidbrücken, auszeichnen.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit Peptide der allgemeinen Strukturformel (I):

$$\overbrace{X^{21}\text{-}X^{22}\text{-}X^{23}\text{-}X^{24}\text{-}X^{25}\text{-}X^{26}\text{-}X^{27}\text{-}X^{28}\text{-}X^{29}} - [X^{30}]_n - [Y]_m \qquad (I)$$

worin

X^{21} bis X^{30} jeweils eine Aminocarbonsäure, vorzugsweise eine α-Aminocarbonsäure bedeuten und X^{21} und X^{29} miteinander verbrückt sind,

Y ein Spacer ist,

m und n jeweils unabhängig 0 oder 1 sind,

und die monomeren Bausteine über $-NR^1CO-$ oder $-CONR^1-$ Bindungen verknüpft sind, wobei R^1 jeweils unabhängig Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeutet, und pharmazeutisch verträgliche Salze und Derivate davon.

Die monomeren Bausteine X^{21} bis X^{30} weisen vorzugsweise folgende Bedeutungen auf:

X^{21} und X^{29} sind α-Aminocarbonsäurebausteine, die miteinander verbrückt werden können, besonders bevorzugt weisen sie eine SH-Seitenkette, insbesondere eine Cysteinseitenkette oder eine dazu strukturell verwandte Seitenkette, z.B. eine Penicillaminseitenkette, auf. Alternativ können X^{21} und X^{29} auch zwei über eine Thioethergruppe verbundene α-Aminocarbonsäurereste sein, z.B. eine Lanthioningruppe.

X^{22} und X^{27} sind jeweils unabhängig α-Aminocarbonsäuren mit einer aliphatischen Seitenkette, vorzugsweise einer aliphati-

BNSDOCID: <WO___9846632A2_I_>

schen hydrophilen Seitenkette, insbesondere einer Amidseitenkette wie etwa Asparagin oder Glutamin, insbesondere Asparagin.

X^{23} ist eine α-Aminocarbonsäure mit einer basischen Seitenkette, z.B. Lysin, Ornithin oder Arginin oder mit einer aliphatischen hydrophilen Seitenkette, z.B. mit einer Amidseitenkette wie Glutamin oder Asparagin. Besonders bevorzugt ist X^{23} Lysin.

X^{24} und X^{25} sind jeweils unabhängig α-Aminocarbonsäuren mit einer aromatischen Seitenkette, beispielsweise Tyrosin, Phenylalanin oder Tryptophan. Besonders bevorzugt ist X^{24} Tyrosin und X^{25} Phenylalanin.

X^{26} ist eine α-Aminocarbonsäure mit einer aliphatischen Seitenkette, vorzugsweise mit einer aliphatischen hydrophilen Seitenkette wie etwa Hydroxyvalin, Homoserin, Serin oder Threonin, insbesondere Serin. X^{26} kann aber auch eine aliphatische hydrophobe Seitenkette aufweisen wie etwa Alanin.

X^{28} ist eine α-Aminocarbonsäure mit einer aliphatischen Seitenkette, vorzugsweise mit einer aliphatischen hydrophoben Seitenkette wie etwa Valin, Norvalin, Norleucin, Isoleucin, Leucin oder Alanin. Besonders bevorzugt ist X^{28} Isoleucin.

X^{30} - falls vorhanden - ist eine α-Aminocarbonsäure mit einer aromatischen Seitenkette, vorzugsweise mit einer Tryptophan-Seitenkette. Gegebenenfalls kann die Tryptophanseitenkette modifiziert sein, beispielsweise durch Reduktion.

Die erfindungsgemäßen Peptide sind vorzugsweise von der uPA-Sequenz abgeleitet und enthalten mindestens 2, besonders bevorzugt mindestens 3, beispielsweise 4 Aminosäurereste, die auch an entsprechenden Positionen der nativen uPA-Sequenz vorkommen. Besonders bevorzugt weisen mindestens 2 der Aminosäurereste X^{22}, X^{23}, X^{24}, X^{25}, X^{26}, X^{28} und X^{30} eine gleiche Seitenkette wie eine Aminosäure an gleicher Position in der nativen uPA-Sequenz auf. Am meisten bevorzugt weisen mindestens 2 der

BNSDOCID: <WO___9846632A2_I_>

Aminosäurereste X^{24}, X^{25}, X^{28} und - falls vorhanden - X^{30} die gleiche Seitenkette wie in der nativen uPA-Sequenz auf.

Y ist eine Spacergruppe, z. B eine aus einer oder mehreren Aminosäuren aufgebaute peptidische Spacergruppe, z.B. Poly-Lys, oder eine andere Spacergruppe, z.B. eine Polyethylenglykolgruppe. Das Peptid kann über die Gruppe Y an Trägersubstanzen gekoppelt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit zyklische Peptide mit einem neungliedrigen Ring, wobei mindestens 2, vorzugsweise mindestens 3 und besonders bevorzugt mindestens 4 der den Ring bildenden Aminosäurereste eine Sequenz aus der uPA-Region 22 bis 28 aufweisen.

Neben Peptiden der Strukturformel (I) sind auch pharmazeutisch verträgliche Salze und Derivate davon als uPA-Antagonisten geeignet. Als Derivate kommen dabei insbesondere solche Verbindungen in Betracht, die an reaktiven Gruppen der Seitenkette oder/und des N- bzw. C-Terminus, z. B. an Amino- oder Carbonsäuregruppen, modifiziert sind. Beispiele für solche Modifikationen sind eine Acylierung, z. B. eine Acetylierung von Aminogruppen oder/und eine Amidierung oder Veresterung von Carbonsäuregruppen.

Als Bausteine für die erfindungsgemäßen Peptide verwendeten Aminocarbonsäuren können natürliche Aminosäuren bzw. deren Enantiomere oder auch nicht natürlich vorkommende Aminosäuren wie etwa γ-Aminobuttersäure, β-Alanin eingesetzt werden.

Die monomeren Bausteine sind über Säureamidbindungen NR^1CO oder $CONR^1$ verknüpft, d. h. die Peptidsequenzrichtung kann umgekehrt werden (Retropeptide). R^1 kann wie in nativen Polypeptiden Wasserstoff bedeuten. Andererseits kann R^1 jedoch auch einen Alkylrest, z. B. Methyl oder Ethyl, und insbesondere Methyl bedeuten, da durch eine N-Alkylierung der Amidbindung oftmals eine starke Aktivitätsbeeinflussung bewirkt werden kann (vgl. z. B. Levian-Teitelbaum et al., Biopolymers 28 (1989), 51-64).

BNSDOCID: <WO___9846632A2_I_>

Als monomere Bausteine können die α-Aminocarbonsäuren in Form von L-Enantiomeren oder/und D-Enantiomeren eingesetzt werden. Durch die Änderung der Chiralität kann die Raumstruktur der erfindungsgemäßen Peptide modifiziert werden, wodurch ebenfalls eine Aktivitätsbeeinflussung möglich wird. Besonders bevorzugt sind Retro-inverso Petide, d. h. Peptide, die in einer umgekehrten Sequenzrichtung vorliegen und D-Aminosäuren als monomere Bausteine enthalten. Bei diesen Retro-Inversostrukturen haben die funktionellen Seitenketten eine ähnliche räumliche Orientierung wie die in der nativen Peptidsequenz, sie können jedoch aufgrund des Vorhandenseins von D-Aminosäuren schlechter biologisch abgebaut werden und haben daher Vorteile als Arzneimittel (vgl. hierzu beispielsweise Wermuth et al., J. Am. Chem. Soc. 119 (1997), 1328-1335 und die darin genannten Zitate).

Die erfindungsgemäßen Peptide sind zyklische Verbindungen, wobei insbesondere die monomeren Bausteine X^{21} und X^{29} miteinander verbrückt sind. Diese Verbrückung kann beispielsweise über die Seitenketten der jeweiligen α-Aminocarbonsäurereste erfolgen, wobei eine Verbrückung über Disulfidbindungen, z. B. zwischen zwei Cysteinresten besonders bevorzugt ist. Andere Arten der Zyklisierung zwischen Aminosäureseitenketten sind jedoch auch möglich, z. B. Amidbindungen zwischen einer Aminosäure mit einer Aminoseitengruppe, z. B. Ornithin oder Lys und einer Aminosäure mit einer Carbonsäureseitengruppe wie etwa Asp oder Glu. Weiterhin kann die Disulfidbrücke auch durch eine Alkylen-Brücke ersetzt werden, um die chemische Stabilität zu erhöhen. Darüber hinaus sind auch Verknüpfungen von einer Aminosäureseitenkette mit dem Peptidrückgrat, z. B. Verknüpfung einer Aminoseitengruppe, z.B. einer ω-Aminoseitengruppe, mit dem C-terminalen Ende bzw. Verknüpfung einer Carbonsäureseitengruppe mit dem N-terminalen Ende möglich. Auch eine Verknüpfung von N- und C-Terminus ist möglich.

Besonders bevorzugt ist, wenn mindestens eine der Aminosäuren X^{21}, X^{27}, X^{29} und X^{30} eine D-Aminosäure ist. Besonders bevorzugt ist mindestens eine der Aminosäuren X^{21} und X^{30} eine D-Amino-

BNSDOCID: <WO__9846632A2_I_>

säure, z.B. D-Cystein.

Außerdem können anstelle der Disulfidbrücke auch sogenannte Turn-Mimetika (Haubner et al., J. Am. Chem. Soc. 118 (1996), 7884-7891) oder Zuckeraminosäuren (Graf von Rödern et al., J. Am. Chem. Soc. 118 (1996), 10156-10167) eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen Peptide sind durch chemische Synthese wie in den Beispielen erläutert erhältlich. Alternativ können die erfindungsgemäßen Peptide auch Bestandteile von rekombinanten Polypeptiden sein.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Peptide, die vom linearen Peptid uPA (19 bis 31) und zyklischen Derivaten davon abgeleitet sind und an ausgewählten Positionen D-Aminosäurereste tragen. Solche Peptide weisen die allgemeine Strukturformel (II) auf:

$$X^1-[X^2]_n-[X^3]_m-X^4-K-Y-F-X^5-X^6-I-X^7-W-[X^8]_r \qquad (II)$$

worin

X^1 bis X^8 jeweils eine Aminocarbonsäure, vorzugsweise eine α-Aminocarbonsäure bedeuten und X^1 und X^7 oder X^1 und X^8 gegebenenfalls miteinander verbrückt sind,

n, m und r jeweils unabhängig 0 oder 1 sind,

K wie X^{23} definiert ist und vorzugsweise eine α-Aminocarbonsäure mit einer Lysin-Seitenkette bedeutet,

Y wie X^{24} definiert ist und vorzugsweise eine α-Aminocarbonsäure mit einer Tyrosin-Seitenkette bedeutet,

F wie X^{25} definiert ist und vorzugsweise eine α-Aminocarbonsäure mit einer Phenylalanin-Seitenkette bedeutet,

I wie X^{28} definiert ist und vorzugsweise eine α-Aminocarbonsäure mit einer Isoleucin-Seitenkette bedeutet,

W wie X^{30} definiert ist und vorzugsweise eine α-Aminocarbonsäure mit einer Tryptophan-Seitenkette bedeutet,

und die monomeren Bausteine über $-CONR^1-$ oder $-NR^1CO-$Bindungen verknüpft sind, wobei R^1 jeweils unabhängig Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeutet, und pharmazeutisch verträgliche Salze und Derivate davon und wobei mindestens einer der Aminosäurereste

BNSDOCID: <WO___9846632A2_I_>

X^1, X^2, X^3, X^6, I, X^7, W und X^8 einen D-Aminosäurerest bedeutet.

Die monomeren Bausteine X^1 bis X^8 weisen vorzugsweise folgende Bedeutungen auf:

X^1 und - falls vorhanden - X^8 entsprechen der Bedeutung X^{21} und X^{29} und sind z. B. α-Aminocarbonsäurebausteine mit einer SH-Seitenkette, insbesondere mit einer Cysteinseitenkette.

X^2 ist - falls vorhanden - eine α-Aminocarbonsäure mit einer aliphatischen und ungeladenen Seitenkette, z. B. Valin, Leucin oder Isoleucin, insbesondere Valin.

X^3 und X^5 entsprechen der Bedeutung von X^{26} und sind z.B. α-Aminocarbonsäuren mit einer aliphatischen hydrophilen Seitenkette wie etwa Serin oder Threonin, insbesondere Serin.

X^4 und X^6 entsprechen der Bedeutung von X^{22} und X^{27} und sind z.B. α-Aminocarbonsäuren mit einer aliphatischen hydrophilen Seitenkette, insbesondere einer Amidseitenkette wie etwa Asparagin oder Glutamin, insbesondere Asparagin.

X^7 ist - wenn nicht mit X^1 verbrückt - vorzugsweise eine basische α-Aminocarbonsäure, insbesondere Histidin. Bei Verbrükkung mit X^1 ist X^7 eine α-Aminocarbonsäure mit einer SH-Seitengruppe, insbesondere Cystein.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, die als Wirkstoff mindestens ein Peptid oder Polypeptid wie zuvor definiert gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch üblichen Träger, Hilfs- oder Verdünnungsmitteln enthält. Insbesondere werden die erfindungsgemäßen Peptide oder Polypeptide zur Herstellung von uPA-Antagonisten verwendet, die sich auch zur Bekämpfung von mit der Expression von uPAR assoziierten Krankheiten, insbesondere zur Tumorbekämpfung eignen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die

BNSDOCID: <WO___9846632A2_I_>

Verwendung von aus der uPA Sequenz abgeleiteten Peptiden, insbesondere von uPA Antagonisten wie etwa den zuvor genannten Peptiden oder Polypeptiden zur Herstellung von Targetingvehikeln, z.B. Liposomen, viralen Vektoren etc., für uPAR-exprimierende Zellen. Das Targeting kann für diagnostische Anwendungen zum gesteuerten Transport von Markierungsgruppen, z.B radioaktiven oder nichtradioaktiven Markierungsgruppen erfolgen. Andererseits kann das Targeting für therapeutische Anwendungen, z.B. zum Transport von pharmazeutischen Wirkstoffen, beispielsweise auch zum Transport von Nukleinsäuren für die Gentherapie erfolgen.

Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen können in beliebiger Form vorliegen, beispielsweise als Tabletten, als beschichtete Tabletten oder in Form von Lösungen oder Suspensionen in wässrigen oder nichtwässrigen Lösungsmitteln. Die Peptide werden vorzugsweise oral oder parenteral in einer flüssigen oder festen Form verabreicht. Bei Verabreichung in flüssiger Form wird Wasser vorzugsweise als Trägermedium verwendet, das gegebenenfalls Stabilisatoren, Löslichkeitsvermittler oder/und Puffer enthält, die üblicherweise für Injektionslösungen verwendet werden. Solche Zusatzstoffe sind beispielsweise Tartrat- oder Boratpuffer, Ethanol, Dimethylsulfoxid, Komplexierungsmittel wie etwa EDTA, Polymere wie etwa flüssiges Polyethylenoxid, etc.

Bei Verabreichung in fester Form können feste Trägersubstanzen wie etwa Stärke, Lactose, Mannitol, Methylcellulose, Talkum, hochdisperses Siliciumoxid, hochmolekulare Fettsäuren wie etwa Stearinsäure, Gelatine, Agar, Calciumphosphat, Magnesiumstearat, tierische und pflanzliche Fette oder feste hochmolekulare Polymere wie etwa Polyethylenglykole eingesetzt werden. Weiterhin können die Formulierungen zu oralen Applikation sofern gewünscht auch Aroma- und Süßstoffe enthalten.

Die erfindungsgemäßen therapeutischen Zusammensetzungen können auch in Form von Komplexen vorliegen, z.B. mit Cyclodextrinen wie etwa γ-Cyclodextrin.

BNSDOCID: <WO___9846632A2_I_>

Die verabreichte Dosis hängt vom Alter, Gesundheitszustand und Gewicht des Patienten, von der Art und der Schwere der Erkrankung, von der Art der Behandlung, von der Häufigkeit der Verabreichung und der Art der gewünschten Wirkung ab. Die tägliche Dosis der aktiven Verbindung ist üblicherweise 0,1 bis 50 mg/Kilogramm Körpergewicht. Normalerweise sind 0,5 bis 40 und vorzugsweise 1,0 bis 20 mg/kg/Tag in einer oder mehreren Dosen ausreichend, um die gewünschten Wirkungen zur erreichen.

Weiterhin soll die Erfindung durch die im Nachfolgenden beschriebenen Beispiele und Figuren erläutert werden.

Es zeigen:

Figur 1 die mengenabhängige Hemmung der Bindung von pro-uPA an einen zelloberflächenassoziierten uPAR durch synthetische Peptide;

Figur 2 die Kompetition synthetischer Peptide mit ATF um die Bindung an uPAR;

Figur 3A die Struktur von cyclo$^{19-31}$ uPA 19-31 (rechts) im Vergleich zur Struktur der entsprechenden Domäne aus nativem uPA;

Figur 3B die Struktur des zyklischen Peptidderivats cyclo^{21,29} [Cys 21,29]uPA$_{21-30}$;

Figur 4 die Hemmung der uPA/uPAR-Interaktion mittels synthetischer Peptide und

Figur 5 die Hemmung des Tumorwachstums in Nacktmäusen durch Verabreichung synthetischer Peptide.

BNSDOCID: <WO___9846632A2_I_>

Beispiele

1. Methoden

1.1 Festphasenpeptidsynthese

Lineare Peptide wurden auf einem 2-Chlortritylharz (Barlos et al., Int. J. Pept. Protein Res. 37 (1991), 513 bis 520) unter Verwendung eines Applied Biosystems Modell 431 A Peptidsynthesizers bzw. eines multiplen Peptidsynthesizers Modell Syro II (MultiSynTech) synthetisiert. Unter Anwendung der orthogonalen Fmoc-Strategie (Carpino und Han, J. Org. Chem. 37 (1972), 3404-3409; Fields und Noble, Int. J. Peptide Protein Res. 35 (1990), 161-214) wurden die Aminosäureseitenketten mit den Schutzgruppen Trityl (Asn, Cys, Gln und His), tert.-Butyloxycarbonyl (Lys und Trp), tert.-Butyl (Asp, Glu, Ser, Thr und Tyr), Acetamidomethyl (Cys) und 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl oder 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Arg) blockiert. Die Kupplung erfolgte bei Raumtemperatur in Dimethylformamid unter Verwendung eines dreifachen Überschusses von 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat/1-Hydroxybenzotriazol/Fmoc-Aminosäure mit 2,5 Äquivalenten von N-Ethyldiisopropylamin in N-Methylpyrrolidon. Die Fmoc-Gruppe wurde durch sequenzielle Behandlung der Harze mit einem Überschuß von 40 % bzw. 20 % Piperidin in Dimethylformamid entfernt. Die Abspaltung der Peptide und die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen wurde gleichzeitig durch Behandlung mit 82,5 % Trifluoressigsäure/5 % Phenol/2,5 % Ethandithiol/5 % Thioanisol/5 % H_2O (0 °C/1 h; Raumtemperatur/1h) durchgeführt. Im Fall von mit 2,2,5,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl-geschützten Arg-Gruppen wurden die Peptide für zusätzliche 12 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die rohen Peptide wurden mit Diethylether bei -30 °C präzipitiert, in Methanol gelöst, wie zuvor präzipitiert, in tert.-Butanol gelöst und lyophilisiert. Tryptophan enthaltende Peptide wurden zusätzlich mit 5 % Essigsäure für 2 h vor der Lyophilisierung behandelt.

BNSDOCID: <WO___9846632A2_I_>

Die Peptide wurden durch HPLC unter Verwendung einer Reverse Phase C-18 Säule (Nucleosil 1005-C18) oder einer YMC-Pack ODS Säule gereinigt. Die Zyklisierung erfolgte durch eine Disulfidbrückenbildung über die Cysteinreste. Die hierzu erforderliche Oxidation wurde durch Aufnehmen von 0,1 bis 0,3 mg/ml der gereinigten linearen Peptide in 80 % Wasser und 20 % DMSO (Vol/Vol) und Entfernen des Lösungsmittels unter verringertem Druck nach 10 h durchgeführt. Die zyklischen Peptide wurden erneut durch HPLC wie zuvor beschrieben gereinigt.

1.2 Massenspektroskopie und Aminosäureanalyse

Die gereinigten und entsalzten Peptide wurden auf dem HPLC-System 140 B (Applied Biosystems, Foster City, USA) analysiert. Die UV-Absorption wurde mit einem UVIS 200 Detektor (Linear Instruments, Reno, USA) bei 206 nm gemessen. Die Chromatographie erfolgte auf einer Aquapore 3 μ (Applied Biosystems, Foster City, USA) Reverse Phase Säule (1 mm x 50 mm) mit einer Durchflußrate von 20 μl/min. Das Lösungsmittelsystem war 0,1 % TFA in Wasser (A) und 0,1 % TFA in Acetonitril (B). Das HPLC System war an eine Atmosphärendruck-Ionisationsquelle gekoppelt, die an ein Tandem-Quadrupolinstrument API III (Sciex, Perkin Elmer, Thornhill, Kanada) angeschlossen war.

Die Quadrupol M/Z-Skala wurde mit den Ammoniumadduktionen von Polypropylenglykol kalibriert. Die durchschnittlichen Massenwerte wurden von den M/Z-Peaks in den Ladungsverteilungsprofilen der mehrfach geladenen Ionen berechnet (Covey et al., Rapid Commun. Mass Spectrom. 2 (1988), 249-256; Fenn et al., Science 246 (1989), 64-71).

Die Aminosäureanalyse wurde nach der Ninhydrinmethode unter Verwendung des Analysesystems 6300 (Beckman Instruments, Fullerton, USA) nach Hydrolyse der Peptide durch die TFA-HCl-Dampfphasenmethode (Tsugita et al., J. Biochem. 102 (1987), 1593-1597) durchgeführt, die eine quantitative Bestimmung der Peptidkonzentration erlaubt.

BNSDOCID: <WO___9846632A2_I_>

1.3 Durchflußzytometrie

Die Kapazität der synthetischen Peptide zu Hemmung der uPA/-uPAR-Wechselwirkung wurde mittels Durchflußzytometrie an dem FACScan Durchflußzytometer (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) unter Verwendung der humanen Promyeloidzellinie U937 als Quelle für zellulären nativen uPAR bestimmt (Chuchulowski et al., Fibrinolysis 6, Suppl. 4 (1992), 95-102; Magdolen et al., (1996), supra). Die U937 Zellen wurden mit 1 mM Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) für 48 h stimuliert. Nach Stimulierung mit PMA exprimieren die U937 Zellen beträchtliche Mengen an zelloberflächenassoziiertem uPAR.

Die stimulierten Zellen wurden mit 50 mM Glycin-HCl, 0,1 NaCl, pH 3,6 für 1 min bei Raumtemperatur behandelt, um endogenen rezeptorgebundenen uPA zu dissoziieren. Anschließend wurde der saure Puffer durch 0,5 M HEPES-100 mM NaCl, pH 7,5 neutralisiert. Die Zellen wurden dann sofort zweimal mit PBS/0,1 % Rinderserumalbumin (RSA) gewaschen und für 10 min bei Raumtemperatur und 300 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden in PBS/0,1 % RSA resuspendiert, auf eine Konzentration von 10^6 Zellen pro ml eingestellt und simultan mit 16 ng FITC-konjugiertem pro-uPA und unterschiedlichen Mengen der synthetischen Peptide für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Analyse wurde Propidiumiodid, ein Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch doppelsträngige DNA bindet, zu jeder Probe gegeben, um die Lebensfähigkeit der analysierten U937 Zellen zu bestimmen. Die beschädigten, Propidiumiodid-markierten Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen.

1.4 Festphasen uPAR/uPA-Bindetest

Zusätzlich zu den durchflußzytometrischen Analysen wurde ein Festphasen ATF-Ligandenbindetest zur Untersuchung der Wechselwirkungen von synthetischen Peptiden mit uPAR durchgeführt. Hierzu wurden Mikrotiterplatten mit rekombinantem humanem uPAR aus CHO Zellen (Wilhelm et al., FEBS Lett. 337 (1994), 131-134; Magdolen et al., Elektrophoresis 16 (1995), 813-816)

BNSDOCID: <WO___9846632A2_I_>

beschichtet und die restlichen proteinbindenden Stellen mit 2 % RSA (Gew/Vol) abgesättigt. Nach Inkubation mit den Proben (0,6 ng ATF zusammen mit 15 µg synthetisches Peptid pro ml) und mehrfachen Waschschritten wurde die Menge an ATF, die an den auf der Mikrotiterplatte immobilisierten uPAR gebunden hatte, unter Verwendung eines biotinylierten monoklonalen Mausantikörpers gegen die Kringeldomäne von ATF (Nr. 377, American Diagnostica, Greenwich, CT, USA) und anschließender Zugabe von Avidin-Peroxidase-Konjugat und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin/H_2O_2 als Substrat für die Peroxidase bestimmt. Das Vorhandensein von synthetischen Peptiden, die mit der ATF-Bindung an uPAR kompetieren, verringert den Umsatz des chromogenen Substrats.

2. Ergebnisse

2.1 Bestimmung der uPAR Bindungskapazität von synthetischen Peptiden durch quantitative durchflußzytometrische Analyse

Es wurde die inhibitorische Kapazität der Peptide uPA_{12-32}[C19A] (Appella et al., (1987), supra), des sogenannten Klon 20-Peptids AEPMPHSLNFSQYLWYT (Goodson et al., (1994), supra), welches das wirksamste aus einer Phagen Peptidbibliothek identifizierte Peptid war, und des von der Wildtyp uPA-Sequenz abgeleiteten synthetischen Peptid uPA_{16-32} verglichen.

Hierzu wurden die gereinigten Peptide durch Massenspektroskopie analysiert, durch Aminosäureanalyse quantifiziert und dann gemäß der in 1.3 beschriebenen Methode durchflußzytometrisch auf ihre Fähigkeit zur Inhibierung der Bindung von fluoreszenzmarkiertem pro-uPA an den uPA Rezeptor auf U937 Zellen getestet. Dabei wurde gefunden, daß pro-uPA von zelloberflächenassoziiertem uPAR durch alle drei synthetischen Peptide in einer dosisabhängigen Weise verdrängt wurde (Fig.1). Ein etwa 15.000 bzw. 12.000 molarer Überschuß an uPA_{12-32}[C19A] bzw. Klon 20 Peptid führte zu einer 50 %igen Hemmung der Bindung von uPA. Das Peptid uPA_{16-32} zeigte eine 4- bis 5-fach höhere Affinität an uPAR verglichen mit den zwei anderen Peptiden: Ein

BNSDOCID: <WO___9846632A2_I_>

etwa 3.000-facher molarer Überschuß reichte aus, um eine 50 %ige Hemmung zu erhalten.

Weiterhin wurde festgestellt, daß das lineare Peptid uPA_{19-31} überraschenderweise einen IC50-Wert von ca. 0,8 µM zeigt, während der IC50-Wert für uPA_{16-32} ca. 3,2 µM beträgt.

2.2 Bestimmung der uPAR-Bindekapazität von synthetischen Peptiden in einem Mikrotiterplatten-Festphase-Liganden-Bindetest.

Es wurde eine Reihe von Peptiden mit variablen Sequenzbereichen aus dem rezeptorbindenden Bereich von uPA synthetisiert, die ausgehend von uPA_{10-32} zunehmend vom Aminoterminus verkürzt wurden. Zur Bestimmung der inhibitorischen Kapazität dieser Peptide wurde der unter 1.4 beschriebene Mikrotiterplatten-Festphasenbindetest verwendet. Die Ergebnisse dieses Tests sind in Fig. 2 dargestellt.

Aus Fig. 2A ist ersichtlich, daß die Peptide uPA_{10-32}, uPA_{12-31}, uPA_{14-32} und uPA_{16-32} wirksam die Bindung von ATF an uPAR inhibieren. Die Peptide uPA_{17-32} und uPA_{18-34} zeigten deutlich verringerte uPAR-Bindekapazitäten. Das Peptid uPA_{20-34} zeigte überhaupt keine Bindung an den uPAR. In einem weiteren Versuch wurde die Bindekapazität der Peptide uPA_{19-31}, uPA_{18-30}, uPA_{20-32} und uPA_{20-30} getestet. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Fig. 2B dargestellt. Überraschenderweise wurde festgestellt, daß uPA_{19-31} mit höherer Affinität als das längere Peptid uPA_{16-32} an den uPAR bindet. Die anderen getesteten linearen Peptide zeigten keine signifikante Bindekapazität.

Das zyklische Peptid $cyclo^{19-31}uPA_{19-31}$, welches eine intramolekulare Disulfidbindung zwischen den Cysteinresten an den Positionen 19-31 enthält, war überraschenderweise immer noch in der Lage, die Bindung von uPA an den uPA Rezeptor zu hemmen. $cyclo^{19-31}uPA_{19-31}$ war darüber hinaus in seiner Bindeaktivität signifikant stabiler nach längerer Aufbewahrung in wässriger Lösung oder wiederholten Einfrier/Tau-Zyklen verglichen mit

BNSDOCID: <WO___9846632A2_I_>

dem linearen Peptid uPA_{19-31}.

2.3 Systematisches Ersetzen von L-Aminosäuren durch D-Aminosäuren bei chemisch synthetisierten linearen und zyklischen Peptiden aus dem Bereich uPA_{19-31}

Es wurde die uPAR-Bindungskapazität von synthetischen linearen und zyklischen Peptiden aus dem Bereich uPA_{19-31} bestimmt, bei denen jeweils eine L-Aminosäure durch die entsprechende D-Aminosäure ersetzt worden war. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in der nachfolgenden Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

D-Aminosäure	Peptidstruktur	Hemmung
Trp30	[D-Trp^{30}]uPA_{19-31}	++
Trp30	cyclo[D-Trp^{30}]uPA_{19-31}	+
His29	[D-His^{29}]uPA_{19-31}	++
His29	cyclo[D-His^{29}]uPA_{19-31}	+
Asn27	[D-Asn^{27}]uPA_{19-31}	++
Asn27	cyclo[D-Asn^{27}]uPA_{19-31}	++
Ser21	[D-Ser^{21}]uPA_{19-31}	++
Ser21	cyclo[D-Ser^{21}]uPA_{19-31}	++
Val20	[D-Val^{20}]uPA_{19-31}	++
Val20	cyclo[D-Val^{20}]uPA_{19-31}	+
Cys19	[D-Cys^{19}]uPA_{19-31}	+++
Cys19	cyclo[D-Cys^{19}]uPA_{19-31}	+++
cyclo19-31	cyclo[19-31]uPA_{19-31}	+++

Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, daß die Einführung von D-Aminosäuren an den Positionen Cys19, Val20, Ser21, Asn27, His29 und Trp30 sowohl bei linearen als auch zyklischen Peptiden möglich ist, ohne daß die Hemmwirkung verlorengeht. Darü-

BNSDOCID: <WO___9846632A2_I_>

ber hinaus wurde festgestellt, daß bei linearen Peptiden die Hemmwirkung auch bei Einführen von D-Aminosäuren an den Positionen Ile28 und Cys31 nicht verlorengeht.

2.4 Synthese von modifizierten zyklischen uPA Peptiden

Unter Verwendung von cyclo^{19,31}uPA$_{19-31}$ als Leitstruktur wurde ein zyklisches Peptid hergestellt, in dem bestimmte Aminosäuren deletiert und/oder durch andere Aminosäuren substituiert waren. Die Struktur dieser neuen synthetischen Peptidvariante cyclo^{21,29}[Cys21,29]uPA$_{21-30}$ ist in Fig. 3 gezeigt. In Abweichung von der unter 1.1 angegebenen Synthesemethode erfolgt die Herstellung dieses Peptids an einem Tritylchlorid-Polystyrolharz.

Fig. 4 zeigt die inhibitorische Wirkung dieser synthetischen Peptidvariante im Vergleich zu cyclo^{19,31}uPA$_{19-31}$ und cyclo^{19,31}[D-Cys19]uPA$_{19-31}$.

2.5 in vivo Wirkung

4-6 Wochen alten Balbc/3 Nacktmäusen wurden an der rechten Flanke 6x10^6 humane Brustkrebszellen MDA-MB-231 (Price et al., Cancer Res. 50 (1990), 717-721) in einem Gesamtvolumen von 300 µl injiziert. Vor der Injektion wurden die Krebszellen mit jeweils 200 µg der zyklischen uPA-Peptide cyclo^{19,31}uPA$_{19-31}$ und cyclo^{21,29}[Cys21,29]uPA$_{21-30}$ in PBS pH 7,4 vermischt. Anschließend wurden die Mäuse zweimal wöchentlich mit dem jeweiligen Peptid in einer Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht intraperitonial behandelt (Injektionsvolumen 300 µl). Das Volumen der in den Mäusen auftretenden Primärtumoren in cm³ wurde nach 1, 2, 3, und 5 Wochen durch Messung an den beiden größten Durchmessern bestimmt. Den Kontrollmäusen wurde PBS pH 7,4 verabreicht. Jede Gruppe bestand aus 5 Mäusen. Die Ergebnisse für das Peptid cyclo^{19,31}uPA$_{19-31}$ sind in Tab. 2 gezeigt.

BNSDOCID: <WO___9846632A2_I_>

Tabelle 2

Woche	Kontrolle	uPA-Peptid
1	0	0
2	0,34 ± 0,3	0,086 ± 0,047
3	0,71 ± 0,5	0,303 ± 0,129
5	2,33 ± 0,32	0,62 ± 0,21*

*p=0,02

In Fig. 5 ist das Volumen des Primärtumors nach fünfwöchiger Behandlung gezeigt. Es ist zu erkennen, daß die Verabreichung beider Peptide zu einer signifikanten Verringerung des Tumorwachstums in vivo führte.

BNSDOCID: <WO___9846632A2_I_>

Ansprüche

1. Peptide der allgemeinen Strukturformel (I):

$$\overline{X^{21}\text{-}X^{22}\text{-}X^{23}\text{-}X^{24}\text{-}X^{25}\text{-}X^{26}\text{-}X^{27}\text{-}X^{28}\text{-}X^{29}}\text{-}[X^{30}]_n\text{-}[Y]_m \qquad (I)$$

worin
X^{21} bis X^{30} jeweils eine Aminocarbonsäure bedeuten und X^{21} und X^{29} miteinander verbrückt sind,
Y ein Spacer ist,
n und m jeweils unabhängig 0 oder 1 sind,
und die monomeren Bausteine über $-NR^1CO-$ oder $-CONR^1-$ Bindungen verknüpft sind, wobei R^1 jeweils unabhängig Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeutet, und pharmazeutisch verträgliche Salze und Derivate davon.

2. Verbindungen nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Aminsäurereste X^{21}-X^{30} jeweils unabhängig ein der nachfolgend angegebenen Bedeutungen besitzen:

(i) X^{21} und X^{29} sind jeweils Aminocarbonsäurereste mit einer SH-Seitenkette oder 2 Aminocarbonsäurereste, die über eine Thioetherbindung verbrückt sind;

(ii) X^{22} und X^{27} sind jeweils unabhängig Aminocarbonsäurereste mit einer aliphatischen Seitenkette, vorzugsweise mit einer aliphatischen hydrophilen Seitenkette, besonders bevorzugt mit einer Amidseitenkette;

(iii) X^{23} ist ein Aminocarbonsäurerest mit einer basischen oder einer aliphatischen hydrophilen Seitenkette;

(iv) X^{24}, X^{25} und X^{30} sind jeweils unabhängig Aminocarbonsäurereste mit aromatischen Seitenketten,

(v) X^{26} ist ein Aminocarbonsäurerest mit einer aliphatischen Seitenkette, vorzugsweise mit einer aliphatischen hydrophilen Seitenketten, besonders bevorzugt mit einer Hydroxyseitenkette und

(vi) X^{28} ist eine Aminocarbonsäurerest mit einer alipha-

BNSDOCID: <WO___9846632A2_I_>

tischen Seitenkette, vorzugsweise mit einer aliphatischen hydrophoben Seitenkette.

3. Verbindungen nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß X^{24}, X^{25}, X^{28} und X^{30} jeweils unabhängig eine der nachfolgenden Bedeutungen besitzen:
(i) X^{24} hat eine Tyrosin-Seitenkette;
(ii) X^{25} hat eine Phenylalanin-Seitenkette;
(iii) X^{28} hat eine Alanin-, Leucin- oder Isoleucin-Seitenkette, vorzugsweise eine Isoleucin-Seitenkette und
(iv) X^{30} hat eine gegebenenfalls modifizierte Tryptophan-Seitenkette.

4. Verbindungen nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß mindestens 2 der Aminosäurereste X^{22}, X^{23}, X^{24}, X^{25}, X^{26}, X^{27}, X^{28} und X^{30} eine gleiche Seitenkette wie eine Aminosäure an gleicher Position in der nativen uPA-Sequenz aufweisen.

5. Verbindungen nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß mindestens 2 der Aminosäurereste X^{24}, X^{25}, X^{28} und X^{30} die gleiche Seitenkette wie in der nativen uPA-Sequenz aufweisen.

6. Verbindungen nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Verbrückung von X^{21} und X^{29} über Seitenketten der Aminocarbonsäurereste erfolgt.

7. Verbindungen nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Verbrückung über Disulfidbindungen erfolgt.

BNSDOCID: <WO___9846632A2_I_>

8. Zyklische Peptide mit einem neungliedrigen Ring, **dadurch gekennzeichnet,** daß mindestens 2 der den Ring bildenden Aminosäurereste eine aus dem Bereich der Aminosäuren 22-28 von uPA stammende Sequenz aufweisen.

9. Peptide nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet,** daß die den Ring bildenden Aminosäurereste eine Bedeutung entsprechend den Aminoresten X^{21} bis X^{29} gemäß den Ansprüchen 1 bis 7 besitzen.

10. Polypeptide, **dadurch gekennzeichnet,** daß sie als Strukturelemente mindestens ein Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 9 enthalten.

11. Peptide der allgemeinen Strukturformel (II):

$$X^1-[X^2]_n-[X^3]_m-X^4-K-Y-F-X^5-X^6-I-X^7-W-[X^8]_r \qquad (II)$$

worin:
X^1, X^2, X^3, X^4, X^5, X^6, X^7 und X^8 jeweils eine Aminocarbonsäure bedeuten,
n, m und r jeweils unabhängig 0 oder 1 sind,
K eine α-Aminocarbonsäure mit einer Lysin-Seitenkette bedeutet,
F eine α-Aminocarbonsäure mit einer Phenylalanin-Seitenkette bedeutet,
I eine α-Aminocarbonsäure mit einer Isoleucin-Seitenkette bedeutet,
W eine α-Aminocarbonsäure mit einer Tryptophan-Seitenkette bedeutet,
und die monomeren Bausteine über $-NR^1CO-$ oder $-CONR^1-$ Bindungen verknüpft sind, wobei R^1 jeweils unabhängig Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeutet, und pharmazeutisch verträgliche Salze und Derivate davon, **dadurch gekennzeichnet,**

BNSDOCID: <WO___9846632A2_I_>

daß mindestens einer der Aminosäurereste X^1, X^2, X^3, X^6, I, X^7, W und X^8 einen D-Aminosäurerest bedeutet.

12. Verbindungen nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß die monomeren Bausteine X^1 und X^7 oder X^1 und X^8 miteinander verbrückt sind.

13. Pharmazeutische Zusammensetzung, die als Wirkstoff mindestens ein Peptid oder Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 12 gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch üblichen Träger-, Hilfs- oder Verdünnungsmitteln enthält.

14. Verwendung eines Peptids oder Polypeptids nach einem der Ansprüche 1-12 zur Herstellung eines uPA-Antagonisten.

15. Verwendung nach Anspruch 14 zur Bekämpfung von mit der Expression von uPAR assoziierten Krankheiten, insbesondere zur Tumorbekämpfung.

16. Verwendung eines Peptids oder Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 12 zur Herstellung eines Targetingvehikels für uPAR-exprimierende Zellen.

BNSDOCID: <WO___9846632A2_I_>

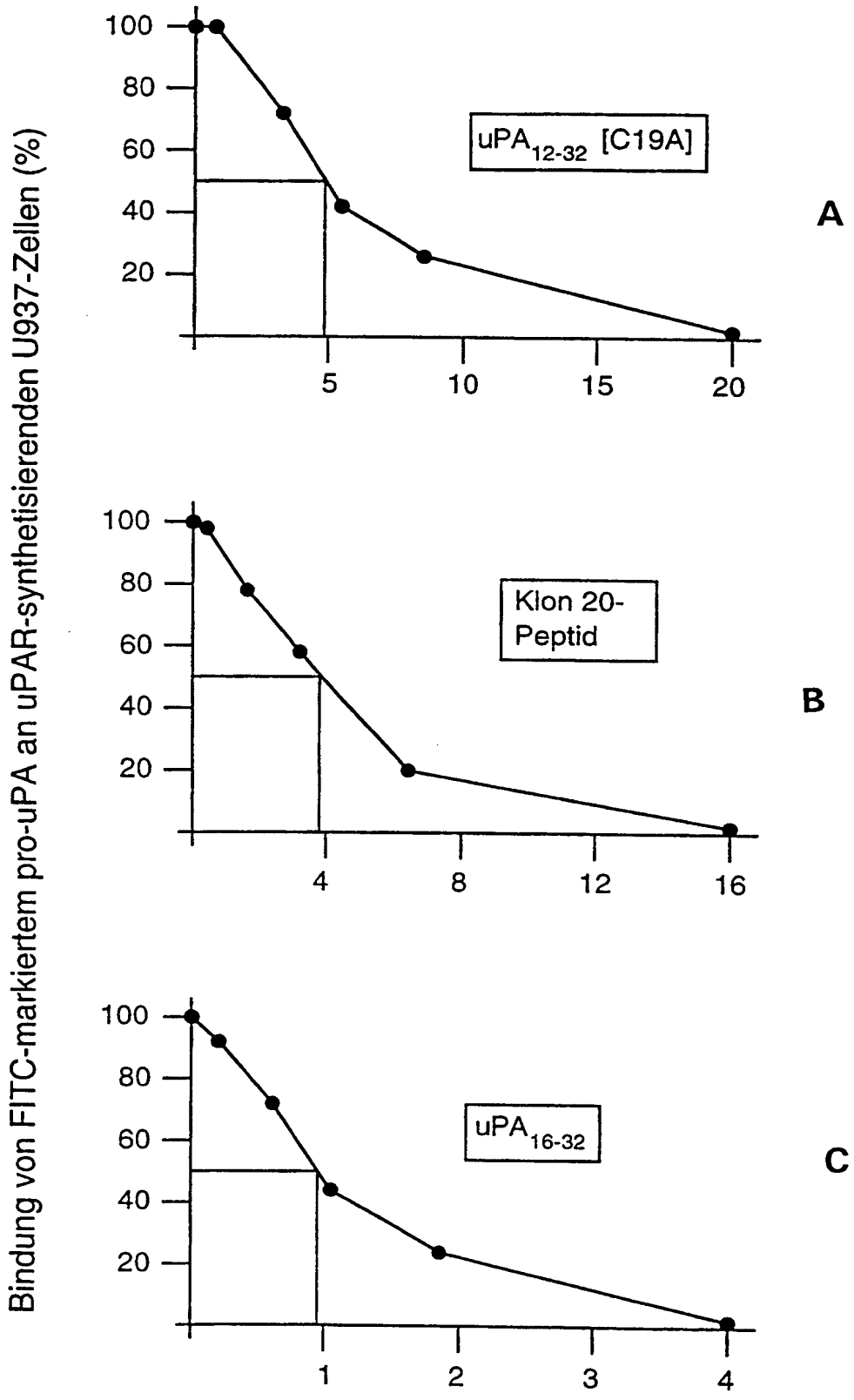
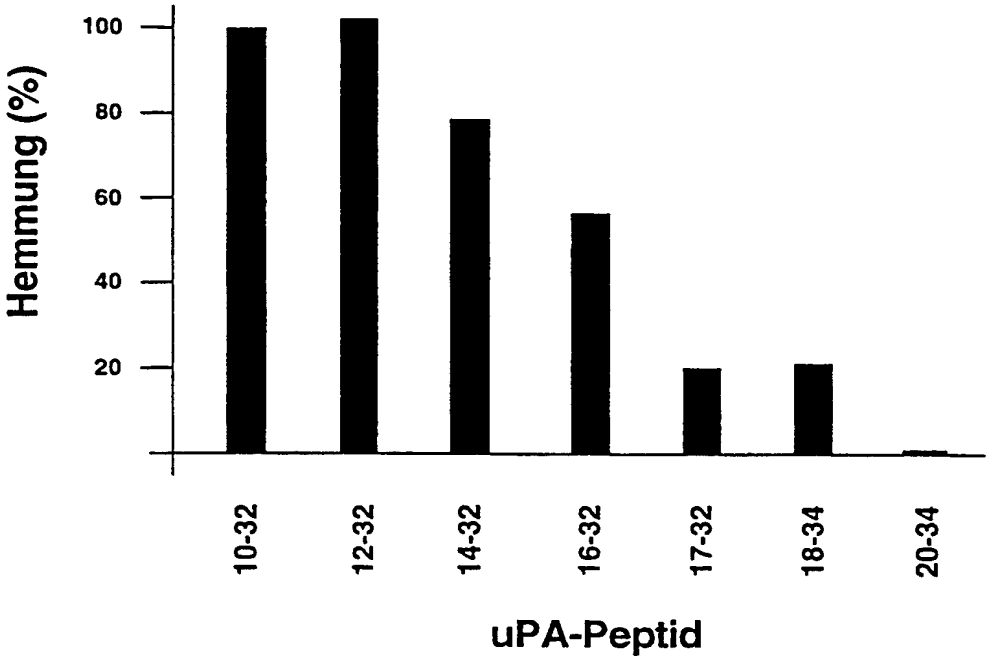


Abb. 1

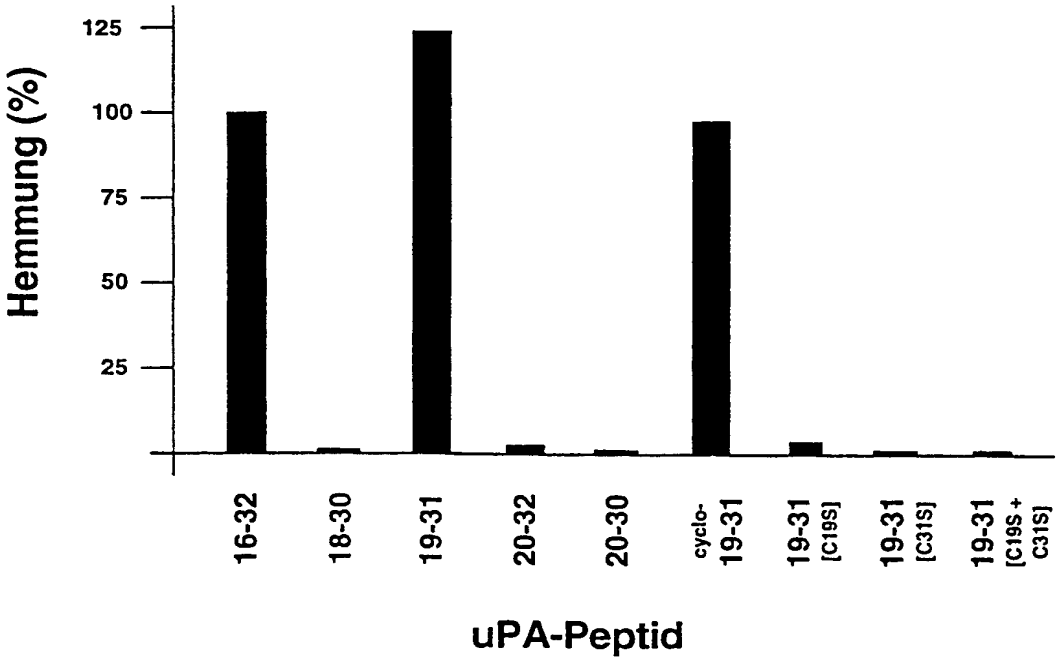
ERSATZBLATT (REGEL 26)

BNSDOCID: <WO___9846632A2_I_>

A



B

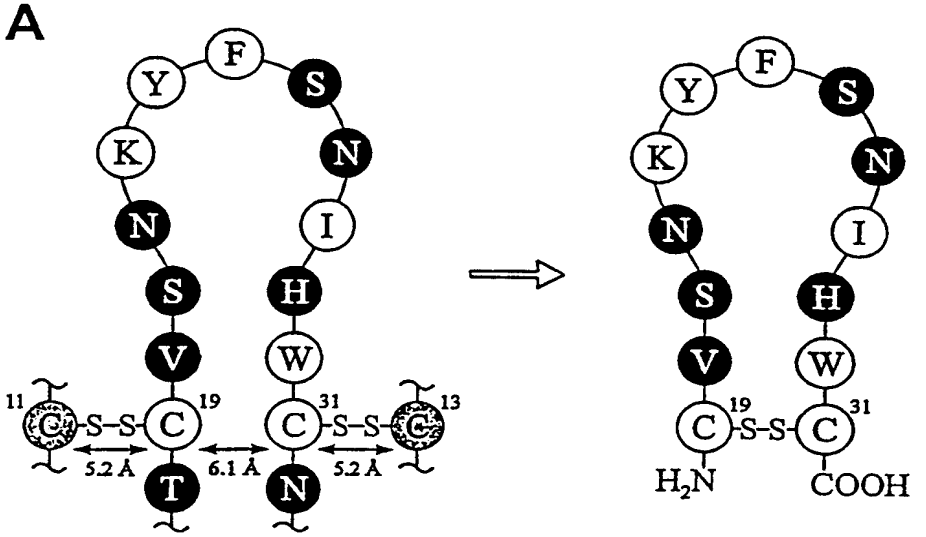


ERSATZBLATT (REGEL 26)

Abb. 2

BNSDOCID: <WO___9846632A2_I_>

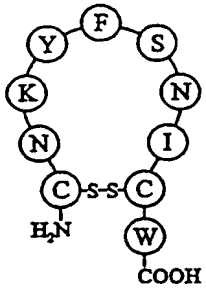
A



native uPAR-Bindungs-domäne von uPA

Peptid cyclo^{19,31}uPA$_{19-31}$

B



Figur 3

ERSATZBLATT (REGEL 26)

BNSDOCID: <WO___9846632A2_I_>

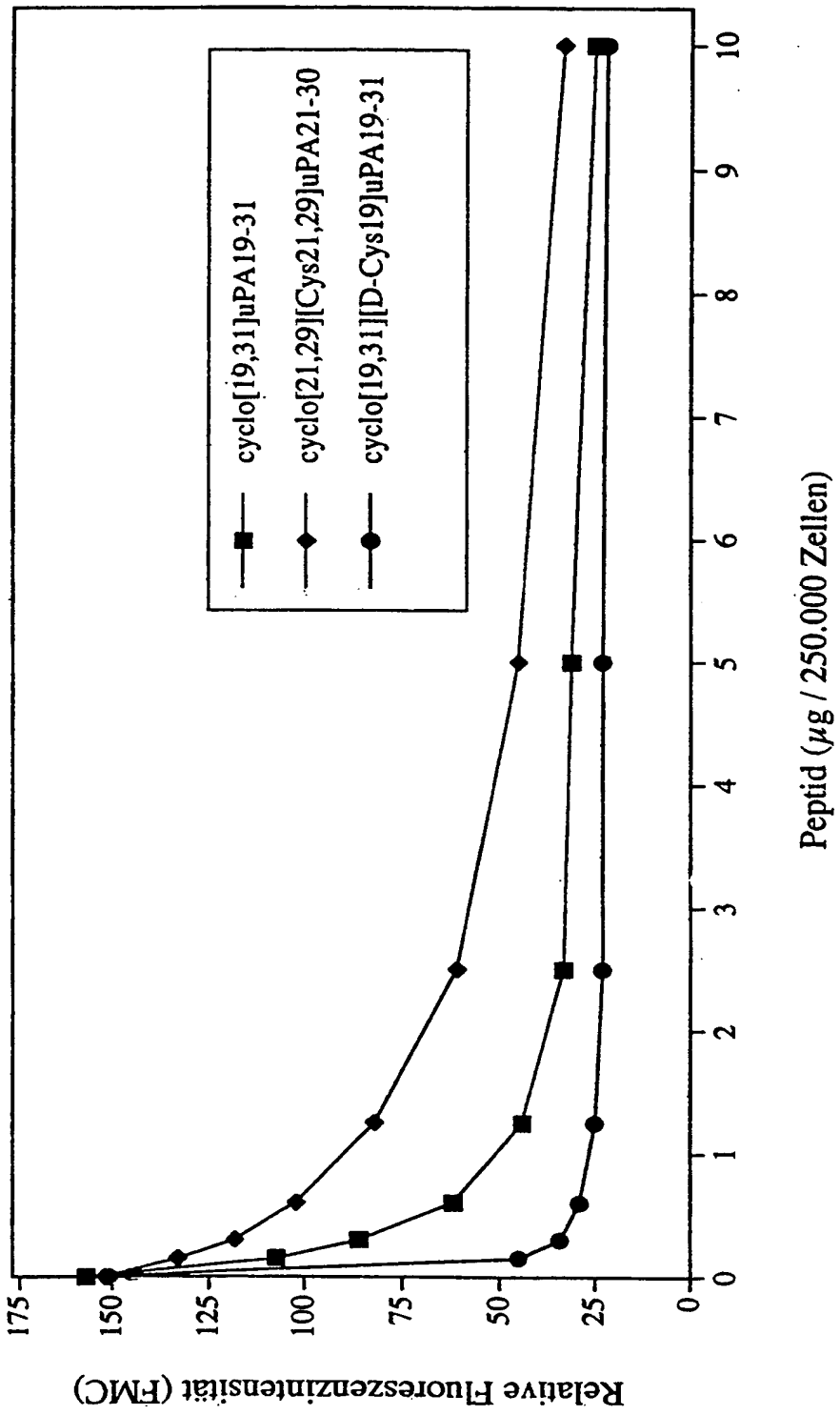
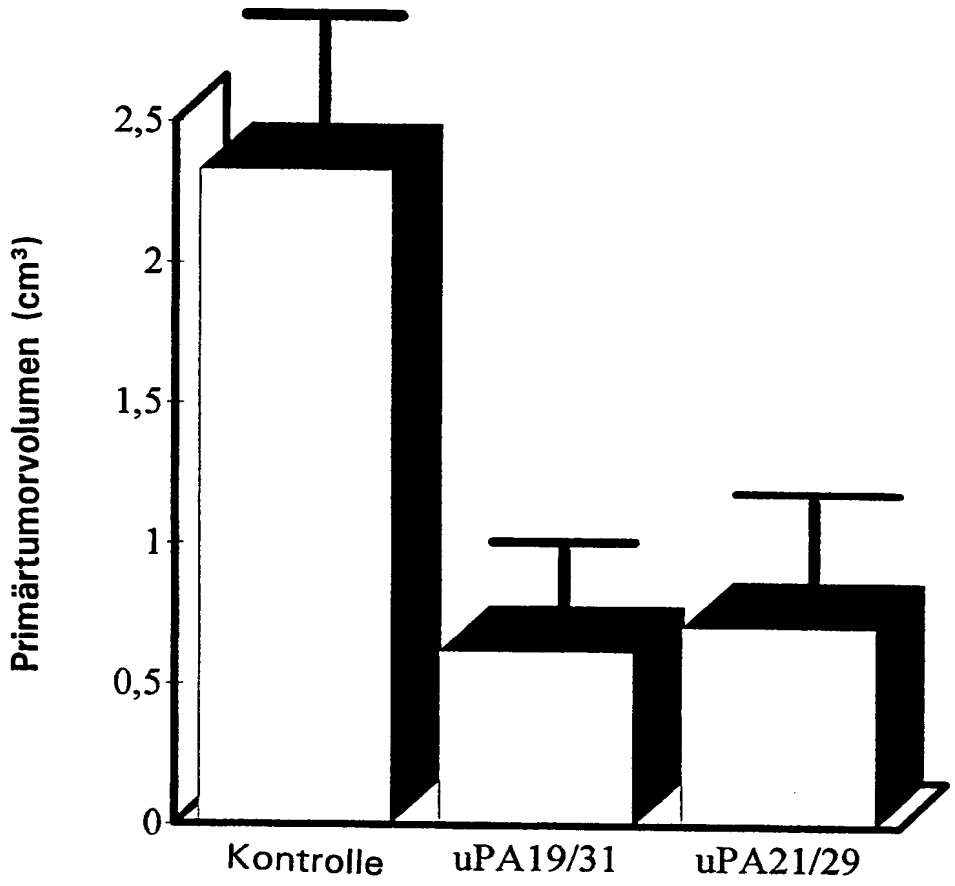


Abb. 4

BNSDOCID: <WO___9846632A2_I_>

Abb. 5



BNSDOCID: <WO___9846632A2_I_>

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :		(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:
C12N 9/72, C07K 7/06, A61K 38/49, 38/04, C07K 14/705	**A3**	**WO 98/46632**
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Oktober 1998 (22.10.98)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/02179

(22) Internationales Anmeldedatum: 14. April 1998 (14.04.98)

(30) Prioritätsdaten:
97 106 024.9 11. April 1997 (11.04.97) EP
(34) Länder für die die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist: DE usw.

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: WILEX BIOTECHNOLOGY GMBH [DE/DE]; Grillparzer Strasse 10 B, D–81675 München (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: KESSLER, Horst [DE/DE]; Friedrich–Stolze–Strasse 53, D–65824 Schwalbach–Limes (DE). GRAEFF, Heinrich [DE/DE]; Josef–Schwarz–Weg 11, D–81479 München (DE). SCHMITT, Manfred [DE/DE]; Hohenaschauer Strasse 10, D–81669 München (DE). MAGDOLEN, Viktor [US/DE]; Moosachweg 3, D–85551 Kirchheim (DE). WILHELM, Olaf, G. [DE/DE]; Säbener Strasse 188, D–81545 München (DE). RIEMER, Christoph [DE/DE]; Prinzregentenstrasse 139, D–81677 München (DE). BÜRGLE, Markus [DE/DE]; Ötschmannweg 10, D–81369 München (DE).

(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D–81679 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 28. Januar 1999 (28.01.99)

(54) Title: INHIBITORS FOR UROKINASE RECEPTOR

(54) Bezeichnung: INHIBITOREN FÜR DEN UROKINASEREZEPTOR

(57) Abstract

Disclosed are peptides as agents for inhibiting urokinase adhesion to its receptor. Said peptides, preferably cyclical, are suitable as active agents for treating diseases transmitted by the urokinase or the receptor thereof.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Peptide als Inhibitoren für die Bindung von Urokinase an den Urokinaserezeptor. Diese vorzugsweise zyklischen Peptide sind als pharmazeutische Wirkstoffe für Krankheiten geeignet, die durch Urokinase und ihren Rezeptor vermittelt werden.

BNSDOCID: <WO__9846632A3_I_>

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	**ES**	Spanien	**LS**	Lesotho	**SI**	Slowenien
AM	Armenien	**FI**	Finnland	**LT**	Litauen	**SK**	Slowakei
AT	Österreich	**FR**	Frankreich	**LU**	Luxemburg	**SN**	Senegal
AU	Australien	**GA**	Gabun	**LV**	Lettland	**SZ**	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MC**	Monaco	**TD**	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	**GE**	Georgien	**MD**	Republik Moldau	**TG**	Togo
BB	Barbados	**GH**	Ghana	**MG**	Madagaskar	**TJ**	Tadschikistan
BE	Belgien	**GN**	Guinea	**MK**	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	**TM**	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	**GR**	Griechenland			**TR**	Türkei
BG	Bulgarien	**HU**	Ungarn	**ML**	Mali	**TT**	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	**IE**	Irland	**MN**	Mongolei	**UA**	Ukraine
BR	Brasilien	**IL**	Israel	**MR**	Mauretanien	**UG**	Uganda
BY	Belarus	**IS**	Island	**MW**	Malawi	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	**IT**	Italien	**MX**	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	**JP**	Japan	**NE**	Niger	**UZ**	Usbekistan
CG	Kongo	**KE**	Kenia	**NL**	Niederlande	**VN**	Vietnam
CH	Schweiz	**KG**	Kirgisistan	**NO**	Norwegen	**YU**	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**NZ**	Neuseeland	**ZW**	Zimbabwe
CM	Kamerun			**PL**	Polen		
CN	China	**KR**	Republik Korea	**PT**	Portugal		
CU	Kuba	**KZ**	Kasachstan	**RO**	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	**LC**	St. Lucia	**RU**	Russische Föderation		
DE	Deutschland	**LI**	Liechtenstein	**SD**	Sudan		
DK	Dänemark	**LK**	Sri Lanka	**SE**	Schweden		
EE	Estland	**LR**	Liberia	**SG**	Singapur		

BNSDOCID: <WO___9846632A3_I_>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 98/02179

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N9/72 C07K7/06 A61K38/49 A61K38/04 C07K14/705

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category ³	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 94 22464 A (GEN HOSPITAL CORP ;SHISEIDO CO LTD (JP)) 13 October 1994 see page 1 - page 2; claims 1-14	1-16
Y	V.MAGDOLEN ET AL.: "Systematic mutational analysis of the receptor- binding region of the human urokinase- type plasminogen activator" EUR.J.BIOCHEM., vol. 237, 1996, pages 237-51, XP000652373 cited in the application see the whole document	1-16
X	WO 95 14714 A (JOLLA CANCER RES FOUND) 1 June 1995 see page 25; example 3 see page 44 see page 46	1,4-10

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

³ Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 October 1998	09/12/1998

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Deffner, C-A

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

BNSDOCID: <WO___9846632A3_I_>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In ational Application No
PCT/EP 98/02179

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	I.M.TAKENAKA ET AL.: "Hsc70-binding Peptides Selected from a Phage Display Peptide Library that Resemble Organellar Targetting Sequences" J.BIOL.CHEM., vol. 270, no. 34, 1995, pages 19839-44, XP002082849 see table 2 -----	1

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

BNSDOCID: <WO___9846632A3_I_>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In ational Application No
PCT/EP 98/02179

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9422464 A	13-10-1994	AU 6418794 A	24-10-1994
		CA 2159637 A	13-10-1994
		EP 0692968 A	24-01-1996
		EP 0857174 A	12-08-1998
		JP 8510207 T	29-10-1996
		WO 9712905 A	10-04-1997
WO 9514714 A	01-06-1995	AU 682561 B	09-10-1997
		AU 1259695 A	13-06-1995
		EP 0730607 A	11-09-1996
		JP 9509142 T	16-09-1997
		US 5627263 A	06-05-1997

BNSDOCID: <WO___9846632A3_I_>

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In ationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/02179

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N9/72 C07K7/06 A61K38/49 A61K38/04 C07K14/705

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 94 22464 A (GEN HOSPITAL CORP ;SHISEIDO CO LTD (JP)) 13. Oktober 1994 siehe Seite 1 - Seite 2; Ansprüche 1-14 ---	1-16
Y	V.MAGDOLEN ET AL.: "Systematic mutational analysis of the receptor- binding region of the human urokinase- type plasminogen activator" EUR.J.BIOCHEM., Bd. 237, 1996, Seiten 237-51, XP000652373 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-16
X	WO 95 14714 A (JOLLA CANCER RES FOUND) 1. Juni 1995 siehe Seite 25; Beispiel 3 siehe Seite 44 siehe Seite 46 --- -/--	1,4-10

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
30. Oktober 1998	09/12/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Deffner, C-A

1

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

BNSDOCID: <WO___9846632A3_I_>

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/02179

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	I.M.TAKENAKA ET AL.: "Hsc70-binding Peptides Selected from a Phage Display Peptide Library that Resemble Organellar Targetting Sequences" J.BIOL.CHEM., Bd. 270, Nr. 34, 1995, Seiten 19839-44, XP002082849 siehe Tabelle 2 -----	1

1

BNSDOCID: <WO___9846632A3_I_>

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

In ...tionales Aktenzeichen
PCT/EP 98/02179

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9422464 A	13-10-1994	AU 6418794 A	24-10-1994
		CA 2159637 A	13-10-1994
		EP 0692968 A	24-01-1996
		EP 0857174 A	12-08-1998
		JP 8510207 T	29-10-1996
		WO 9712905 A	10-04-1997
WO 9514714 A	01-06-1995	AU 682561 B	09-10-1997
		AU 1259695 A	13-06-1995
		EP 0730607 A	11-09-1996
		JP 9509142 T	16-09-1997
		US 5627263 A	06-05-1997

BNSDOCID: <WO___9846632A3_I_>